

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 octobre 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/094588 A1

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
 - avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF ULVANS AS ACTIVATORS OF PLANT DEFENCE AND RESISTANCE REACTIONS AGAINST BIOTIC OR ABIOTIC STRESSES

(54) Titre : UTILISATION DES ULVANES COMME ACTIVATEURS DES REACTIONS DE DEFENSE DES PLANTES ET DE RESISTANCE CONTRE DES CONTRAINTE BIOTIQUES OU ABIOTIQUES.

(57) Abstract: The invention relates to the use of ulvans, such as extracts of green algae of the genera *Ulva* or *Enteromorpha*, or oligosaccharides derived from ulvans, as activators of plant defence and resistance reactions against biotic or abiotic stresses. The invention also relates to a phytosanitary product containing ulvans and to the use thereof in a plant treatment method.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation des ulvanes, notamment extraits d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes, comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques. Elle concerne également un produit phytosanitaire contenant des ulvanes et leurs utilisations dans un procédé de traitement des plantes.

Utilisation des ulvanes comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques.

5 La présente invention, qui trouve application dans le domaine agricole, a essentiellement pour objet l'utilisation des ulvanes, notamment extraits d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes, comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou
10 abiotiques.

La présente invention a également pour objet des produits phytosanitaires contenant ces ulvanes ou oligosaccharides dérivés d'ulvanes ainsi qu'un procédé de traitement des plantes, notamment par voie foliaire ou racinaire les utilisant.

15 Les plantes peuvent être attaquées par de multiples agents pathogènes (champignons, bactéries, virus, viroïdes, protozoaires, nématodes, herbivores) avec pour conséquences des pertes de rendement et une baisse de qualité de la production.

20 Parallèlement à la lutte chimique, qui recourt à l'utilisation de pesticides, de nouvelles stratégies de protection des végétaux ont vu le jour.

25 En effet, bien que dépourvues de système immunitaire analogue aux animaux supérieurs, les plantes disposent de leur propre arsenal de défense. La connaissance de ces mécanismes permet d'envisager leur exploitation pour lutter contre les maladies.

Le contrôle par la plante des effets du pathogène résulte d'une série d'événements déclenchés dans les cellules végétales à partir du moment où la plante est attaquée :

1. reconnaissance de l'agent pathogène,
2. envoi de cette information au noyau,
3. induction de gènes de défense puis synthèse de composés anti-microbiens,
4. transmission du signal d'alarme à toute la plante et à ses voisines.

Ainsi, pour augmenter la capacité de réponse et donc de résistance
35 d'une plante vis-à-vis de certains pathogènes, une des stratégies possibles

consiste à induire préalablement à l'attaque du pathogène les réactions de défense par l'utilisation de molécules signaux.

Ces molécules signaux, qui sont de natures chimiques très variées (protéines, peptides, glycoprotéines, lipides et oligosaccharides), sont 5 capables de transmettre l'information d'une attaque même à très faible concentration.

Elles sont pour la plupart d'origine microbienne (par exemple la harpine) ou végétale (par exemple les acides oligogalacturoniques) ou synthétisés chimiquement (par exemple le benzothiadiazole).

10 En réponse aux traitements par ces molécules signaux, la plante réagit en synthétisant des protéines structurelles, qui renforcent la paroi des cellules végétales, des enzymes impliquées dans la synthèse de composés anti-microbiens tels que des phytoalexines, des hydrolases comme des chitinases ou des glucanases et des enzymes inhibitrices qui 15 agissent contre les enzymes hydrolytiques des agents pathogènes.

Dans le cas d'une interaction plante-parasite de type incompatible, les réponses de défense les plus couramment observées sont :

- la mort cellulaire rapide et localisée au site d'infection encore dénommée réponse hypersensible ou "HR",
- 20 - la synthèse et le dépôt de composés phénoliques et de protéines dans la paroi,
- l'accumulation de composés antimicrobiens et la synthèse de protéines dites "PR" (pour Pathogenesis-Related).

25 Le renforcement des barrières structurales, qui peut ralentir ou inhiber la progression du pathogène à l'intérieur de la plante, est souvent associé à la HR. Par exemple, le dépôt de callose dans la paroi ou les plasmodesmes, ainsi que la synthèse de lignines permettent de ralentir les invasions fongiques ou virales. De même, les HRGP extensines (pour Hydroxyprolin Rich GlycoProtein) et les GRP (pour Glycin Rich Protein) 30 peuvent, par leur rôle de renforcement de la paroi, rendre cette dernière plus difficile à dégrader.

35 Les phytoalexines, composés antimicrobiens de faible poids moléculaire, permettent dans certains cas de lutter directement contre les parasites, en raison de leur capacité à s'accumuler rapidement autour du point d'infection en empêchant ainsi la progression de l'invasion. Plus de 350 phytoalexines ont été isolées et caractérisées à partir d'une trentaine

de familles de végétaux. Elles présentent une grande diversité de structures et dérivent des métabolismes secondaires du shikimate, de l'acétate-malonate et de l'acétate-mévalonate. Certaines se retrouvent dans plusieurs familles de végétaux, alors que d'autres sont spécifiques
5 d'une famille donnée. C'est le cas notamment des isoflavones des Légumineuses ou des sesquiterpènes des Solanacées. Il est cependant à noter que les phytoalexines ne semblent pas jouer de rôle crucial dans la résistance à tous les agents pathogènes, comme par exemple pour *Arabidopsis thaliana*.

10 La HR est aussi accompagnée de la synthèse de protéines PR. Ces protéines intra- ou extra-cellulaires s'accumulent dans les plantes après leur inoculation par des agents pathogènes et, dans le cas d'interactions incompatibles, peuvent constituer jusqu'à 10% des protéines solubles de la feuille. Pour certaines, un rôle actif dans la dégradation de la paroi
15 d'agents pathogènes fongiques (β -glucanase, chitinase) a été montré.

Il est à noter que les trois phénomènes précités (renforcement de la paroi, synthèse de phytoalexines et synthèse de protéines PR) accompagnent la HR sans en être exclusifs. En effet, la synthèse de protéines GRP et HRGP a aussi été détectée lors d'interactions
20 compatibles, ainsi que consécutivement à une blessure.

Les algues marines constituent une ressource végétale abondante et sont, depuis longtemps, utilisées sur les régions côtières comme fertilisants du sol. La germination des graines, l'obtention de meilleurs rendements, une résistance aux maladies, une durée de conservation plus
25 longue des fruits ont été mises en évidence par suite de traitements de plusieurs plantes par des extraits d'algues. Les conclusions en matière de santé des plantes avaient essentiellement été attribuées à la richesse en bétaines, en phytohormones et en oligo-éléments des algues utilisées.

Il est aujourd'hui reconnu que certains oligosaccharides d'origine
30 marine présentent un effet éliciteur sur certaines voies de défense des plantes. Ainsi, le document WO 99/03346 décrit l'utilisation d'oligosaccharides de type $\beta(1-3)$ glucanes notamment extraits de l'algue brune *Laminaria digitata* pour la potentialisation et la stimulation des défenses naturelles du blé infecté par la septoriose. Ces $\beta(1-3)$ glucanes
35 induisent également chez les cellules de tabac quatre marqueurs de défense dont l'activité phénylammonialyase (PAL), qui est une enzyme clé

pour la synthèse des phytoalexines, et l'activité O-méthyl transférase (OMT), qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de lignine.

Dans le cas des algues rouges, il a été montré que le carraghénane induit l'expression des gènes codant pour la cyclase sesquiterpène, la chitinase et les inhibiteurs de protéinases.

Dans le cas des algues vertes, qui elles aussi sont riches en polysaccharides, aucune étude n'a démontré à ce jour que des polysaccharides extraits de ces algues présentaient des propriétés élicitrices comparables à celles mises en évidence chez les algues brunes et rouges.

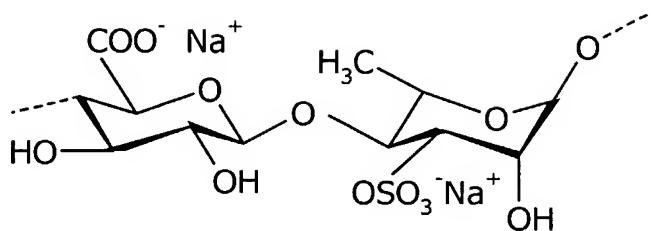
C'est dans ce contexte qu'il a été découvert, et ceci constitue le fondement de la présente invention, que les ulvanes notamment extraits d'algues vertes et les oligosaccharides dérivés de ces derniers permettent, de façon tout à fait surprenante et inattendue, de stimuler l'expression des gènes de défense des plantes et peuvent donc être utilisés comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques, notamment en remplacement des pesticides ou en complément dans des compositions fertilisantes ou dans des engrains.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente demande vise à couvrir l'utilisation des ulvanes, notamment extraits d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes, comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques.

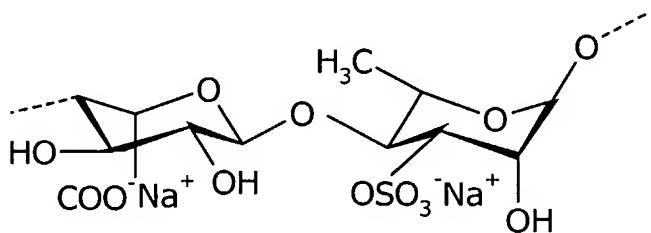
Les ulvanes utiles selon l'invention sont des polysaccharides hydrosolubles présents notamment dans les parois cellulaires des algues vertes des genres *Ulva* et *Enteromorpha*.

Les ulvanes se définissent plus précisément comme des polysaccharides acides fortement sulfatés et sont essentiellement composés d'unités dérivées de rhamnose 3-sulfate, de xylose, de xylose 2-sulfate, d'acide glucuronique et d'acide iduronique.

Les quatre unités récurrentes suivantes sont notamment caractéristiques des ulvanes :

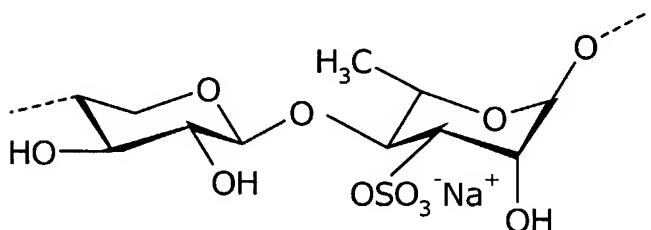


>4)- β-D-GlcA- (1>4)- α-L-Rha 3 sulfate(1>
(encore dénommé acide ulvanobiuronique 3-sulfate type A)



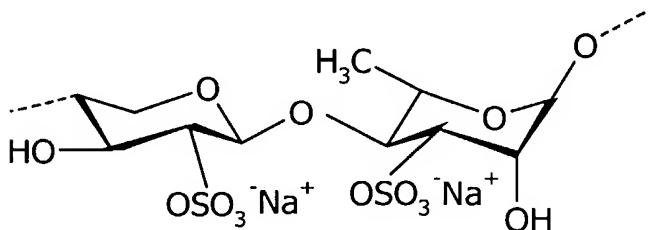
5

>4)- α-L-IdoA- (1>4)- α-L-Rha 3 sulfate(1>
(encore dénommé acide ulvanobiuronique 3-sulfate type B)



10

>4)- β-D-Xyl- (1>4)- α-L-Rha 3 sulfate(1>
(encore dénommé acide ulvanobiose 3-sulfate)



15

>4)- β-D-Xyl 2 -sulfate- (1>4)- α-L-Rha 3 sulfate(1>
(encore dénommé acide ulvanobiose 2',3-disulfate)

Les ulvanes représentent entre 5 et 20% du poids sec de l'algue. Leur poids moléculaire varie entre 90000 et 500000 g.mol⁻¹ chez les genres *Ulva* et *Enteromorpha*.

Avantageusement, les ulvanes utilisés selon la présente invention 5 sont extraits d'algues choisies dans le groupe constitué des espèces suivantes : *Ulva armoricana*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Enteromorpha compressa*.

Des extraits d'algues riches en ulvanes susceptibles d'être utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenus à partir des 10 espèces d'algues précitées, par un procédé comportant généralement les étapes suivantes : lavage, broyage, extraction (séparation solide-liquide) et éventuellement fractionnement et concentration.

L'extrait obtenu peut être plus ou moins concentré selon l'utilisation envisagée. Une déshydratation totale de cet extrait permettant une 15 présentation sous forme pulvérulente hydrosoluble peut être obtenue, par exemple, par séchage à tambour ou par atomisation.

Les oligosaccharides dérivés d'ulvanes susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention peuvent être obtenus par hydrolyse acide ou enzymatique à partir des extraits précités.

20 Les conditions d'extraction et la nature des algues seront choisies de telle façon que l'extrait obtenu présente la concentration souhaitée dans l'application envisagée. Ces choix pourront être facilement réalisés par l'homme du métier, notamment en tenant compte des indications générales qui vont suivre.

25 D'une façon générale la quantité d'ulvanes ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes apportée aux plantes est de 0,1 g à 100 g par litre et préférentiellement de l'ordre de 1 g par litre pour les apports sous forme liquide en foliaire ou dans les solutions nutritives racinaires (hydroponie, goutte à goutte, ...) ou bien encore de 10 à 1000 g/ha et 30 préférentiellement de l'ordre de 200 g/ha pour les apports sous forme solide dans les engrains pulvérulents ou granulés.

La quantité d'ulvanes apportée aux plantes doit être suffisante pour stimuler l'expression des gènes impliqués dans la défense de la plante. Cette quantité est variable selon la nature de la plante à traiter et le mode 35 de traitement (voie foliaire ou voie racinaire). Cette quantité pourra

notamment être déterminée au cas par cas par la mise en œuvre de tests macroarrays tels que définis ci-dessous.

Selon un deuxième aspect, la présente demande vise à protéger un procédé de traitement des plantes destiné à activer les réactions de défense et de résistance contre les contraintes biotiques ou abiotiques, 5 caractérisé en ce qu'il comprend l'application aux dites plantes d'une quantité efficace d'ulvanes, notamment extraits d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes.

Avantageusement, l'application aux plantes sera réalisée par voie 10 foliaire ou par voie racinaire.

La quantité efficace d'ulvanes ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes apportée aux plantes est de 0,1 g à 100 g par litre et préférentiellement de l'ordre de 1 g par litre pour les apports sous forme liquide en foliaire ou dans les solutions nutritives racinaires (hydroponie, 15 goutte à goutte, ...) ou bien encore de 10 à 1000 g/ha et préférentiellement de l'ordre de 200 g/ha pour les apports sous forme solide dans les engrains pulvérulents ou granulés.

Enfin, selon un troisième aspect, la présente demande vise à protéger un nouveau produit phytosanitaire, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'au moins un ulvane, notamment extrait 20 d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou un oligosaccharide dérivé d'ulvane, éventuellement en association avec une ou plusieurs matières fertilisantes.

Ce produit phytosanitaire se présentera avantageusement sous 25 forme liquide ou sous forme de poudre ou de granule, ces dernières formes solubles pouvant être diluées avec une quantité appropriée de solvants, comme par exemple de l'eau.

Ce produit contiendra avantageusement une quantité efficace d'ulvanes ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes apportée aux plantes de 30 0,1 g à 100 g par litre et préférentiellement de l'ordre de 1 g par litre pour les apports sous forme liquide en foliaire ou dans les solutions nutritives racinaires (hydroponie, goutte à goutte, ...) ou bien encore de 10 à 1000 g/ha et préférentiellement de l'ordre de 200 g/ha pour les apports sous forme solide.

35 A titre d'exemples de produits fertilisants conformes à l'invention, on citera les amendements calcaires, les amendements organiques et les

supports de culture, les engrais racinaires de type NP, PK, NPK, etc., les engrais foliaires ou encore les solutions nutritives racinaires.

Les substances fertilisantes susceptibles d'être utilisées en association avec les ulvanes ou les oligosaccharides dérivés d'ulvanes peuvent être de natures variées et choisies par exemple parmi l'urée, le sulfate d'ammonium, le phosphate naturel, le chlorure de potassium, le sulfate d'ammonium, le nitrate de magnésium, le nitrate de manganèse, le nitrate de zinc, le nitrate de cuivre, l'acide phosphorique, l'acide borique.

La présente invention trouve application dans le traitement d'une très grande variété de plantes.

Parmi celles-ci, on citera en particulier :

- les plantes de grande culture telles que les céréales (blé, maïs),

- les protéagineux (pois),

- les oléagineux (soja, tournesol),

- les plantes prairiales utiles pour l'alimentation animale,

- les cultures spécialisées telles qu'en particulier le maraîchage (laitue, épinard, tomate, melon), la vigne, l'arboriculture (poire, pomme, nectarine), ou l'horticulture (rosiers).

Par l'expression "plante" on entend désigner dans la présente demande la plante considérée dans son ensemble, incluant son appareil racinaire, son appareil végétatif, les graines, semences et fruits.

La présente invention sera maintenant illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

Dans ces exemples, et sauf indication contraire, les pourcentages sont exprimés en poids et la température est la température ambiante.

EXEMPLE 1 – Procédé de préparation d'un extrait d'algue riche en ulvanes utilisable dans le cadre de l'invention

30 A – Description générale

a) Préparation des ulvanes

La fraction d'ulvanes est obtenue par extraction aqueuse d'algues fraîches (100 g d'algues fraîches par litre d'eau).

L'extraction est réalisée sous agitation à 90 °C pendant 2 heures. L'extrait est ensuite filtré sur une membrane (80 µm de porosité). Le solvant (eau) est évaporé pour obtenir une poudre hydrosoluble.

5 b) Préparation des oligoulvanes

Les ulvanes préparés comme indiqué en a) ci-dessus sont hydrolysés dans 1 litre de solution acide (acide trichloroacétique ou acide chlorhydrique concentré à 2-3 mol L⁻¹) à 100 °C pendant 30 mins à 1 h, préférentiellement de l'ordre de 40 mins.

10 L'acide glucuronique, l'acide aldobiuronique, l'ulvanobiouronate et l'acide iduronique ont été identifiés dans les produits d'hydrolyse.

B. Exemple détaillé d'extraction :

15 Un extrait *d'Ulva armoricana* enrichi en ulvanes et en particulier en dérivés d'acide iduronique de type xyloidurorhamnane a été obtenu en suivant le protocole expérimental suivant :

a) Lavage

20 Des algues fraîches de type *Ulva armoricana* sont soumises à deux lavages successifs dans un bac d'eau, afin d'éliminer le sable et les graviers.

Les algues sont ensuite déposées dans des paniers grillagés en inox avant d'être introduites dans des bacs où elles sont recouvertes d'eau.

25 Une agitation par des buses d'aération permet de maintenir les algues en suspension en favorisant ainsi la décantation des impuretés.

b) Broyage

Les algues ainsi lavées sont égouttées puis broyées en morceaux de 1 à 10 mm.

30

c) Extraction

1000 kg d'algues sont dispersés dans un réacteur chauffant contenant 10000 kg d'une solution aqueuse portée à une température de 90°C. L'ensemble est maintenu à cette température pendant une durée 35 d'environ 2 heures.

Préalablement à l'extraction, les cellules algales déjà broyées sont micro-éclatées au moyen d'un homogénéisateur de type ULTRA-TURAX® afin de favoriser l'extraction. L'opération de séparation intervient à l'issue des 2 heures d'extraction.

5

d) Séparation

La fraction soluble riche en dérivés d'acide iduronique de type xyloidurorhamnane est séparée des débris d'algues par centrifugation (séparation solide-liquide).

10

L'extrait centrifugé est ensuite filtré, soit sur un filtre à terre de diatomées, soit sur un filtre à plateaux, puis à nouveau filtré sur une membrane jusqu'à 1 µm.

Le filtrat ainsi obtenu comprend entre 0,1 et 1 % en poids d'extrait sec.

15

L'extrait ainsi préparé peut être utilisé sous une forme plus ou moins concentrée, la concentration finale étant déterminée en fonction de la teneur recherchée en dérivés actifs dans l'application envisagée.

20

Ainsi, le filtrat mentionné précédemment peut être concentré, par exemple au moyen d'un évaporateur à flot tombant, de façon à ce que l'extrait sec représente de 10 à 60 % en poids de celui-ci.

Une déshydratation totale peut également être obtenue par exemple par sécheur à tambour ou par atomisation, lorsque l'on recherche une présentation sous forme pulvérulente hydrosoluble.

25

En procédant comme décrit ci-dessus, on a préparé divers extraits à partir de six espèces d'algues vertes des genres *Ulva* ou *Enteromorpha*. La composition de ces extraits secs est présentée dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU 1 : Composition des extraits d'algues vertes

Algues	% d'ulvanes (% du poids sec de l'algue)	% de sucres totaux	% de sulfate	% de protéines
<i>Ulva armoricana</i>	7-15	50-80	10-20	3-7
<i>Ulva rigida</i>	5-18	50-80	13-17	1-10
<i>Ulva rotundata</i>	6-15	50-70	10-20	1-10
<i>Ulva lactuca</i>	5-17	50-70	10-20	1-8
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	5-15	45-75	15-20	1-10

<i>Enteromorpha compressa</i>	5-16	50-75	10-20	1-12
-------------------------------	------	-------	-------	------

Algues	Rha	Gal	Glc	Xyl	GlcA	IdoA
<i>Ulva armoricana</i>	45-50	1-4	5-20	6-15	15-25	5-15
<i>Ulva rigida</i>	50-60	0,5-2	5-8	5-15	18-35	2-5
<i>Ulva rotundata</i>	45-55	1-3	5-15	5-25	16-30	0,5-5
<i>Ulva lactuca</i>	45-60	0,5-5	2-6	1-10	15-25	2-5
<i>Enteromorpha compressa</i>	25-50	1-5	2-10	5-15	10-20	5-10
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	30-50	1-4	1-5	6-15	15-20	5-10

EXEMPLE 2

A - Mise en évidence des effets des ulvanes sur l'expression des gènes
5 d'une plante modèle

Une analyse globale de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la défense d'une plante modèle a été réalisée en faisant appel aux techniques de génomique fonctionnelle. La légumineuse *Medicago truncatula* (nombre important de séquences d'ADN disponibles) a été 10 utilisée comme plante modèle.

On a ainsi étudié l'effet des ulvanes sur environ 200 gènes impliqués dans la défense de cette plante modèle par analyse macroarray.

a) Matériel biologique

15 Des plantes de *Medicago truncatula* lignée F83 005.5 sont cultivées dans un environnement contrôlé (16h / 8h, 20°C / 15°C, 60 % humidité).

Les produits étudiés (extraits obtenus selon le procédé de l'exemple 1) ont été apportés soit par voie foliaire, soit par voie racinaire.

20 Dans le cas de l'apport foliaire, les différentes solutions d'éliciteurs sont pulvérisées sur les feuilles des plantes âgées de 1 mois à la concentration de 1 mg/mL.

Dans le cas de l'apport racinaire, les produits sont introduits dans le milieu nutritif.

25 L'étude de l'expression globale des gènes potentiellement impliqués dans la défense et dans la signalisation a été poursuivie par macroarray.

b) Préparation des Macroarrays

Une sélection d'étiquettes de gènes exprimés (EST) de *Medicago truncatula* basée essentiellement sur leurs implications dans la défense des végétaux et dans le métabolisme primaire est réalisée en utilisant les bases de données TGIR et MENS.

165 EST appartenant aux 144 séquences de *Medicago truncatula* (Tentative consensus sequences (TC)) sont récupérées des librairies MtBA, MtBB et MtBC.

8 fragments génomiques (TC76726, TC77277, TC77910, TC77988, 10 TC78214, TC85619, TC86687, TC85808) sont amplifiés par PCR utilisant l'ADN génomique de *Medicago truncatula* comme amorce. Ces 8 ESTs sont ensuite clonés en pGEM-Teasy vector (Promega) et vérifiés par séquençage.

Les 173 fragments d'ADN sont amplifiés par PCR utilisant les 15 amores universelles complémentaires aux séquences vecteurs encadrant le site de clonage des ADN. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse et sont ajustés à 0,2-0,5 µg/µL avec du DMSO (50%) et déposés sur une membrane à l'aide d'un robot (Eurogridder spotting robot).

20

c) Résultats

L'activité élicitrice des ulvanes extraits d'algues a été étudiée en suivant l'expression de façon simultanée de plusieurs centaines de gènes. Les différentes catégories d'ESTs sélectionnées sont classées par famille : 25 voie des phénylpropanoïdes, biosynthèse des phytoalexines, protéines des parois, défense cellulaire, stress oxydatif, sénescence-HR, voie de l'éthylène, synthèse lipidique, , stress abiotiques, transduction des signaux, nodulines, gènes de ménage.

Les extraits d'algues vertes riches en ulvanes entraînent l'induction 30 de 16 à 31 gènes potentiellement impliqués dans la défense sans perturber le métabolisme primaire. Des réponses similaires sont obtenues pour les 2 types d'apport, i.e. foliaire et racinaire. On note ainsi, pour l'ensemble des traitements, essentiellement l'induction de gènes relatifs aux familles protéines des parois, biosynthèse des phytoalexines et 35 défense cellulaire.

L'induction des gènes est plus importante pour les ulvanes riches en dérivés d'acide xyloidurorhamnane, comme par exemple les ulvanes d'*Ulva armoricana* et d'*Enteromorpha intestinalis*. Ces derniers présentent également la particularité d'induire un gène impliqué dans la voie des 5 oxylipines. Les oligoulvanes obtenus après hydrolyse présentent des résultats identiques.

TABLEAU 2 : Effets des ulvanes de différentes algues vertes sur l'expression de certains gènes en macroarrays

Famille de gènes	Nb de TC ¹	Ulva						Enteromorpha
		U. Ulvane	U. armoricana ²	Oligoulvane	U. rigida	U. rotundata	U. lactuca	
Voie des phénylpropanoïdes	8	4	4		3	3	2	3
Voie des Phytoalexines	10	5	5		2	2	4	5
Protéines des parois	17	6	5	4	5	3	3	6
Stress oxydatif	8	2	2	2	2	1	2	1
Défense cellulaire	20	5	5	5	4	3	3	5
Sénescence-HR	3	1	1	1	1	1	1	1
Production d'éthylène	2	0	0	0	0	0	0	0
Voie des oxylipines	23	2	2	0	0	0	0	1
Stress abiotiques	3	1	1	1	1	1	1	1
Transduction des signaux	8	4	3	4	4	3	3	4
Nodulines	6	0	0	0	0	0	0	0
Autres	8	1	1	0	1	0	0	1
<i>Total</i>	<i>116</i>	<i>31</i>	<i>29</i>	<i>23</i>	<i>23</i>	<i>16</i>	<i>20</i>	<i>29</i>

¹ Les valeurs correspondent au nombre de TC (TIGR Tentative Consensus Sequence) dans chaque famille de gènes.

5

² Les valeurs sont des moyennes de 3 traitements indépendants correspondant au nombre de gènes induits. Seuls les gènes induits deux fois de suite (ratios 1,5) sont inclus.

d) Influence du nombre de traitements sur la sensibilisation de la plante

Une deuxième série d'expérimentations a été réalisée pour évaluer l'effet de la sensibilisation de la plante traitée avec l'extrait d'*Ulva armoricana* lors de l'attaque fongique. L'effet d'un second traitement avec l'extrait d'*Ulva armoricana*, 3 jours après la première pulvérisation, a ainsi été évalué. Les effets sur l'expression des gènes sont étudiés par macroarray.

Les traitements effectués en un ou deux apports induisent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de défense et de signalisation à un degré similaire.

Les traitements induisent l'expression de gènes dans toutes les catégories fonctionnelles :

- celle des phénylpropanoïdes : phénylalanine ammonia-lyase, acide cafféique O-méthyltransférase, cinnamyl-alcool déshydrogénase,
- celle des phytoalexines : chalcone réductase, isoflavone réductase, vestitone réductase,
- celle des protéines pariétales : extensine, glycoprotéine riche en hydroxyproline, protéine riche en arabinogalactane, protéine riche en proline, prolyl hydroxylase endo, endo-1,3-1,4- β -D-glucanase,
- celle des gènes de défense : PR10-1, endochitinase, SRG1, inhibiteur de polygalacturonase, PR1.

Dans le cas du stress oxydatif, on observe l'induction de l'expression de différents gènes codant différentes enzymes : ascorbate péroxydase, péroxydase, superoxyde dismutase, glutathione péroxydase ou glutathione S-transférase.

Au niveau du métabolisme des lipides, différents gènes impliqués dans la voie des oxylipines sont induits, notamment les phospholipases D et C, trois lipoxygénases, une désaturase et une oxophytodiénoate réductase. Deux traitements consécutifs induisent l'expression d'un nombre supérieur de gènes (6 gènes contre 2).

TABLEAU 3 : Effets des ulvanes de *Ulva armoricana* (AV) sur l'expression de certains gènes en macroarrays

TC TIGR ^b	Fonction	Accession dans GB ^c	Traitement ^a					
			AV ^d			AV+AV ^e		
			1	2	3	1	2	3
<u>Voie des phénylpropanoïdes</u>								
TC85501	phénylalanine ammonia-lyase	AL372483	NS	2,33	1,83	1,18	4,44	1,00
TC85550	acide cafféique O-méthyltransférase	AL367074	1,52	1,93	2,54	NS	4,33	1,90
TC85894	caffeoyle-CoA O-méthyltransférase	AL368189	2,03	0,67	1,57	NS	1,22	NS
TC77145	cinnamyl-alcool déshydrogénase	AL372163	1,00	5,47	4,33	1,03	3,40	2,01
<u>Voie des phytoalexines</u>								
TC76884	chalcone synthase	AL369218	1,20	NS	1,45	4,92	0,96	4,01
TC85146	chalcone synthase	AL368203	1,00	2,09	2,34	2,00	NS	1,13
TC85169	chalcone synthase	AL370220, AL385833	1,51	2,93	1,54	2,17	0,97	2,42
TC85521	Chalcone réductase	AL381630	1,00	1,00	NS	1,85	1,00	2,95
TC85633	chalcone isomérase	AL381790	2,01	3,31	1,25	4,88	6,04	5,17
TC85477	isoflavone réductase	AL384237	1,68	3,61	2,55	3,41	2,25	5,99
TC85478	isoflavone réductase	AL383870	1,00	1,00	NS	1,99	2,09	1,00
TC77308	vestitone réductase	AL383703, AL384920	3,96	1,92	3,09	NS	1,00	1,00
<u>Protéines de paroi</u>								
TC76311	extensine	AL381854	1,00	2,76	1,79	2,00	2,34	1,47
TC76716	extensine	AL373614	1,15	3,08	2,59	1,64	3,51	2,12
TC77527	glycoprotéine riche en hydroxyproline	AL370995	0,77	1,19	NS	NS	2,50	1,56
TC79404	protéine riche en arabinogalactane	AL368602	1,00	2,08	5,16	3,33	3,37	2,97
TC86688	protéine riche en arabinogalactane	AL381434	1,00	1,94	4,04	0,75	NS	0,74
TC85413	protéine riche en proline	AL386974	3,97	1,29	2,99	NS	1,60	2,59
TC86651	prolyl hydroxylase	AL367499	1,00	1,00	3,30	1,69	2,50	1,00
TC86689	endo-1,3-1,4- β -D-glucanase	AL387547	1,62	1,89	2,09	1,19	2,51	2,00

<u>Défense</u>								
TC76511	PR10-1	AL382676	1,72	5,69	4,40	3,43	1,54	2,15
TC76513	PR10-1	AL373773	2,14	12,14	2,69	3,29	3,04	1,18
-	PR10-1	Y08641	5,12	19,05	0,99	11,22	2,07	2,70
TC76833	endochitinase	AL380364	1,16	2,19	2,61	1,52	2,22	1,43
TC85427	chitinase	AL388544	1,34	0,75	NS	0,50	NS	0,45
TC85652	SRG1	AL379718	1,41	1,40	NS	1,71	3,50	1,48
TC85805	Inhibiteur de polygalacturonase	AL381114	1,80	1,00	1,89	0,97	NS	1,00
TC86002	PR1	AL386306	1,00	1,00	5,22	1,63	2,81	1,00
TC86646	β -1,3-glucanase	AL378026	1,09	1,00	NS	1,00	5,44	1,36
<u>Stress oxydant</u>								
TC76384	ascorbate peroxydase	AL367369	1,60	2,40	1,00	0,90	0,74	NS
TC85974	péroxydase	AL371851	1,05	1,46	NS	2,77	5,38	2,69
TC76946	superoxyde dismutase	AL375556	2,49	3,12	1,00	1,40	NS	1,00
TC86106	glutathione peroxydase	AL374155	0,88	1,43	1,40	NS	2,08	1,90
TC85451	glutathione S-transférase	AL368847	1,00	1,16	1,00	1,15	1,55	3,01
TC87485	similaire à une germine	AL373691	NS	1,32	1,10	1,16	NS	NS
<u>Sénescence-HR</u>								
TC78195	HSR203	AL366024	1,34	2,58	4,38	1,98	2,78	1,31
<u>Signalisation lipidique</u>								
TC76357	phospholipase D	AL383583, AL387293	1,60	1,39	1,44	2,75	5,49	2,40
TC77257	hydroperoxyde lyase	AL372355	1,35	0,74	1,21	0,84	7,20	1,73
TC82008	phospholipase C	AL380498	1,00	1,04	NS	1,37	4,17	3,45
TC84245	lipoxygénase	AL371045, AL389771	1,00	1,14	1,46	1,57	1,86	0,83
TC85148	lipoxygénase	AL370268, AL381315	1,75	NS	1,11	2,04	2,03	1,03
TC85171	lipoxygénase	AL378899, AL380164	1,00	NS	1,53	2,27	2,75	NS
TC85192	lipoxygénase	AL387727	2,14	1,02	2,04	1,16	NS	1,00
TC85264	lipoxygénase	AL371045, AL389771	1,00	1,14	1,46	1,20	1,57	1,86
TC85619	lipoxygénase		1,00	1,93	2,05	1,44	NS	0,78

TC85808	oxophytodiénoate réductase		1,00	NS	1,00	1,49	1,92	4,42
TC85814	désaturase	AL367066, AL377575	1,54	0,91	0,95	2,28	1,63	1,41
<u>Stress abiotiques</u>								
TC77019	ribonucléase	AL371802	1,52	2,72	1,67	0,47	0,80	NS
<u>Transduction des signaux</u>								
TC77346	protéine kinase similaire à un récepteur	AL383027, AL384392	1,66	1,44	4,89	1,28	NS	1,06
TC76783	calmoduline	AL378480	2,40	1,71	1,52	0,82	1,46	NS
TC76643	protéine de réponse à l'ABA	AL373345	3,27	2,60	1,42	2,04	1,48	NS
TC86374	protéine de transport ABC	AL365693	1,44	1,98	2,71	NS	1,16	NS
<u>Noduline</u>								
TC76916	MtN4	AL376203	0,89	1,11	1,14	NS	1,63	1,58
<u>Autres</u>								
TC86776	β-glucosidase cyanogénique	AL370555	1,03	NS	1,00	1,38	1,65	1,00
TC78462	protéine liant l'acide nucléique	AL367624	1,00	NS	NS	NS	3,41	3,30
TC85305	aquaporine	AL370135	1,04	NS	NS	2,02	1,93	2,61
TC87062	ubiquinol-cytochrome-c réductase	AL386789	NS	4,41	4,54	3,81	8,96	NS

a : Valeurs correspondant aux rapports "intensités des signaux des plantes traitées par l'extrait d'*Ulva* (AV)" sur "intensités des signaux des plantes contrôles". Seuls les gènes induits (rapport >1,5) dans au moins deux expériences indépendantes sont inclus. Lors de notre comparaison des réplicats des trois expériences, nous considérons que le rapport d'un seul gène ne doit pas être induit dans un réplicat et réprimé dans au moins un des autres, sinon il est considéré comme non significatif (NS).

5 b : TC TIGR, numéro de Tentative de Consensus selon The Institute of Genome Research.

c : GB, numéro d'accession dans Genebank.

d : AV, un seul traitement AV.

e : AV+AV, deux traitements AV consécutifs.

EXEMPLE 3 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis-à-vis des stress abiotiques

15 L'expérimentation est conduite sur du maïs cultivé en pots à 25 °C.

L'extrait d'ulvanes est apporté par voie racinaire ou foliaire 17 jours après le semis.

Quatre jours après le traitement, on fait subir aux plantes un stress hydrique ou thermique (15 °C).

20 Les plantes sont récoltées 21 jours après l'application des stress au stade 8 feuilles.

Les résultats de cette expérimentation sont présentés au tableau 4.

L'application d'ulvanes permet de lutter partiellement contre les contraintes hydriques et thermiques en réponse à l'expression des gènes des stress oxydatifs ou abiotiques.

5

Tableau 4 : Effets des ulvanes sur des plants de maïs en état de stress hydrique ou thermique

		Poids sec de la plante (en indice)
Témoin non stressé		100
Stress hydrique		
Témoin sans ulvanes		60
Apport foliaire	Ulvanes 0.1 g/L	82
	Ulvanes 10 g/L	94
Apport racinaire	Ulvanes 10 g/ha	78
	Ulvanes 1000 g/ha	89
Stress thermique		
Témoin sans ulvanes		67
Apport foliaire	Ulvanes 1 g/L	85
	Ulvanes 10 g/L	99
Apport racinaire	Ulvanes 10 g/ha	84
	Ulvanes 1000 g/ha	97

10 EXEMPLE 4 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis-à-vis des oomycètes

L'extrait d'ulvanes est pulvérisé (1g par litre i.e 200 g/ha) sur des plants de colza cultivés en pots au stade 2 feuilles.

Le nombre de plantules par traitement est de 28. L'inoculation par *Pythium* (fonte du semis) est effectuée 3 jours après le traitement.

Les plantules font l'objet d'une observation selon l'échelle de notation suivante :

0	Pas d'attaque
1	Nécrose superficielle d'une longueur inférieure à 1 cm
2	Nécrose superficielle d'une longueur supérieure à 1 cm
3	Nécrose profonde d'une longueur inférieure à 0,5 cm
4	Nécrose profonde d'une longueur inférieure à 1 cm
5	Nécrose profonde d'une longueur supérieure à 1 cm

Les résultats obtenus et présentés dans le tableau 5 ci-dessous montrent que l'extrait d'ulvanes selon l'invention permet de réduire significativement l'incidence de l'attaque par *Pythium*, en réduisant la longueur et la profondeur des nécroses.

5

Tableau 5– Effets du traitement par ulvanes sur du colza infecté par *Pythium*

	Témoin	Ulvanes
Nécrose (indice)	2,92	1,61
Poids frais des plantules (en g)	0,49	0,69

10 La mesure du poids frais des plantules confirme également la meilleure résistance du colza à l'attaque fongique.

EXEMPLE 5 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis-à-vis d'autres attaques fongiques

15

a) Interactions Luzerne (*Medicago truncatula*) – *Colletotrichum trifolii*

Pour contrôler si l'induction par les ulvanes de l'expression des gènes impliqués dans la défense est corrélée à une protection, une inoculation des plantes de *Medicago truncatula* par le champignon *Colletotrichum trifolii* (responsable de l'antracnose) est effectuée sur des plantes âgées de 1 mois.

20 Deux jours après le dernier traitement avec l'extrait d'ulvanes (1 g par litre), les plantes sont inoculées par pulvérisation d'une suspension de spores de *C. trifolii* concentrée à 10^6 cellules/mL sur les parties aériennes (1 mL/plante).

25 Les premiers symptômes sont observés 7 jours et 15 jours après l'infection.

Un mois plus tard, les parties aériennes sont récoltées et pesées pour évaluer le degré de protection du matériel végétal.

30 Quinze jours après l'inoculation, les parties aériennes des plantes non traitées sont totalement nécrosées et la plupart des plantes sont mortes. A l'inverse, seules de petites lésions sont visibles sur les feuilles et les tiges dans le cas des traitements (1 ou 2 apports). Les plantes

inoculées non traitées encore vivantes ont perdu 70 % de leur poids frais en comparaison avec les plantes témoin non inoculées. Les plantes inoculées et traitées n'ont, quant à elles, perdu respectivement que 20 % et 10 % de leur poids frais pour un ou deux apports.

5 Un seul traitement permet d'obtenir une protection de 80 %, tandis qu'un deuxième traitement amène la protection à 90 %.

On obtient conformément à l'étude génomique une protection des plantes prétraitées avec l'extrait d'ulvane. Celle-ci est plus importante lorsque les plantes ont été traitées deux fois de suite par cet extrait avant 10 l'infection.

b) Interactions Pois – *Mycosphaerella pinodes*

L'extrait d'ulvanes (1 g par litre) est pulvérisé sur des plants de pois fourrager au stade 4 feuilles. L'inoculation est effectuée 3 jours après le 15 traitement.

On mesure la longueur de la nécrose résultant de l'attaque ainsi que le poids frais de la plantule.

Les résultats obtenus et représentés au tableau 6 ci-dessous montrent que l'extrait d'ulvanes selon l'invention réduit la longueur des 20 nécroses au niveau de la tige.

L'augmentation de plus de 25 % du poids frais des plantules traitées confirme la meilleure résistance du pois à l'attaque de *Mycosphaerella*.

25 Tableau 6 - Effets du traitement par ulvanes sur du pois fourrager infecté par *Mycosphaerella*

	Longueur de la nécrose (mm)	Poids frais de la plantule (en g)
Témoin	3,17	2,75
Ulvanes	1,79	3,45

c) Interactions Poivron – *Phytophtora capsicum*

30 Des plants de poivrons cultivés en pots sont arrosés avec une solution d'ulvanes à raison de 1 et 10 g par litre. L'inoculation de *Phytophtora* est effectuée à la surface inférieure des feuilles 5 jours après le traitement.

Dans les trois jours qui suivent l'inoculation, on note une diminution significative de la taille des nécroses, comme le montre le tableau 7 ci-dessous.

- 5 Tableau 7 – Evolution du diamètre des nécroses de plants de poivrons après traitement par ulvanes.

	<i>Témoin</i>	<i>Ulvanes</i>	
		1 g/L	10 g/L
Diamètre des nécroses (en mm)	29	17	8

d) Interactions Vigne – *Plasmopara viticola*

- 10 Des plants de vignes cultivés en pots sous serre sont traités avec une solution d'ulvanes (1 g par litre).

Le traitement est réalisé en 1 ou 2 apports sous forme de pulvérisation foliaire. Le deuxième apport est réalisé une semaine après le premier traitement.

- 15 L'inoculation par *Plasmopara viticola* est effectuée 4 jours après le dernier traitement.

Un mois après la contamination, le traitement par la solution d'ulvanes (un apport) a permis de réduire :

- 20 - le ratio de feuilles infectées de 32 %,
- la surface de feuilles atteinte de 35 %,
- et le taux de sporulation de 41 %.

Le double traitement améliore ces résultats avec des réductions du pourcentage de feuilles infectées de 47 %, de la surface de feuilles atteinte de 46 % et du taux de sporulation de 52 %.

25

EXEMPLE 6 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis-à-vis des attaques bactériennes

- 30 Un extrait d'ulvanes selon l'invention (1 g par litre) est pulvérisé sur des plants de tomates. Vingt-quatre heures plus tard, les plantes sont inoculées avec des *Pseudomonas syringae*. La concentration bactérienne des feuilles est déterminée 1, 3, 5 et 7 jours après l'inoculation par comptage des colonies bactériennes.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 - Nombre de bactéries par unité de surface foliaire (nb/cm²)

Traitement	Temps (jours)				
	0	1	3	5	7
Témoin	18000	136000	385000	520000	636000
Produit	24000	95000	224000	312000	440000

Le traitement selon l'invention permet de réduire le niveau de
5 contamination de près de 31 % après 7 jours d'incubation.

EXEMPLE 7 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis à vis des insectes et pathogènes transmis (virus, phytoplasme)

10 L'expérimentation est conduite sur des rosiers cultivés en pots sous serre. Les plantes sont traitées avec un extrait d'ulvanes préparé selon l'exemple 1 (0,1 g par litre ou 10 g par litre) en comparaison avec un témoin eau.

15 On dénombre ensuite le nombre de pucerons par feuille. Les résultats obtenus, représentés au tableau 9 ci-dessous, montrent que les ulvanes limitent l'invasion des pucerons chez les plantes traitées pour l'ensemble des traitements. A la concentration de 0,1 g par litre, le nombre de pucerons est réduit de 35 % dans le cas du traitement unique et de 42 % dans le cas du double traitement. A la concentration de 10 g par litre, la réduction est de 43 % et 58 % respectivement du nombre moyen de pucerons.
20

Tableau 9 – Effet du traitement par ulvanes sur les pucerons

		Apport foliaire	Réduction du nombre de pucerons (en % du témoin)	
			0,1 g/L	10 g/L
Ulvanes	0,1 g/L	1 apport	35	
		2 apports	42	
	10 g/L	1 apport	43	
		2 apports	58	

EXEMPLE 8 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis-à-vis des acariens

L'essai est mené sur des plants de fraisiers cultivés sous serre dans une zone naturellement sensible au développement d'acariens (*Tetranychus urticae*). L'apport de l'extrait d'ulvanes est effectué à deux concentrations (0,1 et 10 g par litre) en un seul ou deux apports séparés d'une semaine.

On mesure le nombre d'acariens par feuille.

Les résultats obtenus, présentés au tableau 10 ci-dessous, montrent que les ulvanes limitent l'invasion des acariens chez les plantes traitées pour l'ensemble des traitements. A la concentration de 0,1 g par litre, le nombre d'acariens est réduit de 33 % dans le cas du traitement unique et de 46 % dans le cas du double traitement. A la concentration de 10 g par litre, la réduction est de 50 % et 63 % respectivement du nombre moyen d'acariens par feuille.

Tableau 10 – Effet du traitement par ulvanes sur des plants de fraisiers infectés par des acariens

		Apport foliaire	Nombre d'acariens par feuille
<i>Témoin (eau)</i>			52
<i>Ulvanes</i>	0,1 g/L	1 apport	35
		2 apports	28
	10 g/L	1 apport	26
		2 apports	19

EXEMPLE 9 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la défense des plantes vis-à-vis des nématodes

Des plants de tomates d'environ 10 cm sont transplantés dans un milieu infesté avec *Meloidogyne incognita*.

Les plantes sont traitées soit par voie foliaire soit par incorporation dans le milieu nutritif de ferti-irrigation, à la dose de 1 g par litre.

Le deuxième apport du traitement est effectué 15 jours après le premier apport.

Le nombre de nématodes est déterminé 1,5 mois après le premier traitement.

Les résultats obtenus ont été reportés au tableau 11

Tableau 11 – Effet du traitement par ulvanes sur des plants de tomates infestés par des nématodes

5

		Nombre de nématodes / g de racines
<i>Témoin</i>		15
<i>Apport foliaire</i>	1 apport	12
	2 apports	9
<i>Apport par ferti-irrigation</i>	1 apport	10
	2 apports	7

L'extrait d'ulvanes réduit significativement le degré d'infection des racines de plants de tomates par les nématodes de 20 à 53 % selon les traitements.

- 10 Un deuxième apport se révèle toujours plus efficace qu'un seul.
L'extrait d'ulvanes renforce la résistance de la plante aux nématodes en inhibant leur pénétration et leur développement dans la racine.

15 EXEMPLE 10 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la protection des semences

On a démontré que les ulvanes ont une action favorable sur la germination des semences contaminées par des agents pathogènes, à l'exemple de *Sclerotinia* sur tournesol, *Phoma lingua* sur colza et 20 *Mycosphaerella pinodes* sur pois.

Le traitement des semences est réalisé par trempage (pendant 12 heures dans une solution d'ulvanes à 1 g par litre).

Dans le cas du témoin, le traitement est réalisée avec de l'eau distillée. L'inoculation des champignons est pratiquée juste avant le semis.

25 On a mesuré le pourcentage de germination et le taux de survie des semences infectées et les résultats obtenus ont été regroupés dans le tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : Effets des ulvanes sur la protection des semences

	Tournesol - <i>Sclerotinia</i>		Colza - <i>Phoma lingua</i> m		Pois - <i>Mycosphaerella</i>	
	Témoin	Ulvanes	Témoin	Ulvanes	Témoin	Ulvanes
% de germination	38	80	63	88	67	89
Taux de Survie (%)	0	47	29	61	42	64

Chez le tournesol, l'inoculation de *Sclerotinia* affecte fortement le
 5 taux de germination (38 %). Le traitement par ulvanes améliore considérablement le taux de germination (80 %). Il renforce également la vigueur des plantules avec un taux de survie de 47 % contre une mortalité totale pour le témoin.

Chez le colza infesté avec *P. lingua*m, le traitement par ulvanes
 10 augmente de 40 % le taux de germination, ainsi que le taux de survie qui s'élève de 29 % pour le témoin à 61 %.

Chez le pois infesté par *M. pinodes*, le traitement par ulvanes améliore de 33 % le taux de germination, ainsi que le taux de survie qui passe de 42 % à 64 %.

Dans le cas du pois, on a également observé que la profondeur de la nécrose passe de 52 mm à 2,9 mm, indiquant un ralentissement de la progression du champignon dans la plante.

Les ulvanes induisent par conséquent une meilleure résistance des semences aux attaques des champignons.

EXEMPLE 11 – Mise en évidence des effets des ulvanes sur la protection post-récolte des fruits et légumes

L'effet des ulvanes sur la conservation des fruits (pommes, oranges, tomates et raisins) est suivi dans des chambres climatiques
 25 maintenues à 17 °C. Le traitement par trempage est réalisé avec une solution d'ulvanes à la concentration de 10 g par litre.

Les fruits traités ou témoins sont inoculés avec une solution de spores de *Botrytis cinerea* concentrée à 10⁵/mL. L'inoculation est réalisée une semaine après le traitement.

30 Les fruits sont contrôlés après 3 mois pour les pommes et 1 mois pour les oranges, les tomates et le raisin.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Effets des ulvanes sur la protection post-récolte des fruits et légumes

5

Fruits	Indice de protection (en % de témoin inoculé)
<i>Pommes</i>	65 %
<i>Oranges</i>	38 %
<i>Tomates</i>	42 %
<i>Raisins</i>	47 %

Le traitement par ulvanes a permis de réduire respectivement de 65 %, 38 %, 42 % et 47 % les dommages post-récolte pour les pommes, les oranges, les tomates et les raisins.

10 Le traitement "ulvanes" prévient et retarde l'apparition des dommages des fruits durant leur conservation. Il améliore ainsi leur temps de conservation.

15 Par conséquent, l'application des ulvanes selon l'invention permet également de réduire les dommages post-récolte liés aux maladies ou aux attaques de pathogènes.

EXEMPLE 12 – Exemples de formulations incorporant des ulvanes

D'une façon générale, la quantité efficace d'ulvanes ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes à utiliser dans le cadre des 20 applications de l'invention sera de 0,1 g à 100 g par litre. pour les apports sous forme liquide en foliaire ou dans les solutions racinaires (hydroponie, goutte à goutte, ...). De préférence, cette quantité sera de 0,1 à 20 g par litre, et encore de préférence de 0,5 à 10 g par litre.

D'une façon générale, la quantité efficace d'ulvanes ou 25 d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes à utiliser dans le cadre des applications de l'invention sera de 10 à 1000 g/ha pour les apports sous forme solide dans les produits pulvérulents ou granulés. De préférence, cette quantité sera de 50 à 500 g/ha, et encore de préférence de 150 à 250 g/ha.

On donnera ci-après, à titre d'exemples, diverses formulations utilisables selon l'invention avec des indications sur les conditions de mise en œuvre de ces formulations.

5 A – AMENDEMENTS

AMENDEMENT CALCAIRE

Lithothamnium	1000 kg
Dérivés d'ulvanes	QSP 200 g/ha
10 Dose d'apport : 1 T/ha	
Carbonate de calcium	1000 kg
Dérivés d'ulvanes	QSP 1000 g/ha
Dose d'apport : 1 T/ha	
15	
	AMENDEMENT ORGANIQUE ET SUPPORTS DE CULTURE
Terreau	500 kg
Tourbe	500 kg
Dérivés d'ulvanes	QSP 500 g/ha
20 Dose d'apport : 1T/ha	

B - ENGRAIS RACINAIRES

25 ENGRAIS NP

Lithothamnium	310 kg
Chlorure de potassium	167 kg
Urée	161 kg
Sulfate d'ammoniaque	362 kg
30 Dérivés d'ulvanes	QSP 200 g/ha

CULTURES	DOSE D'APPORT (kg/ha)
Pâtures	
Céréales	
Maïs	200 - 400

ENGRAIS PK

Lithothamnium	297 kg
Phosphate naturel	536 kg
Chlorure de potassium	167 kg
5 Dérivés d'ulvanes	QSP 500 g/ha

CULTURES	DOSE D'APPORT (kg/ha)
Toutes cultures	300 - 500

ENGRAIS NPK + MgO

Lithothamnium	158 kg
10 Phosphate d'ammoniaque	116 kg
Sulfate d'ammoniaque	186 kg
Urée	156 kg
Oxyde de magnésium	50 kg
Chlorure de potassium	334 kg
15 Dérivés d'ulvanes	QSP 1000 g/ha

CULTURES	DOSE D'APPORT (kg/ha)
Maïs	
Céréales	400 - 800
Prairies	
Toutes cultures	

C - ENGRAIS FOLIAIRES

20	<i>SOLUTION Mg</i>	
	Nitrate de Magnésium	50 kg
	Eau	50 kg
	Dérivés d'ulvanes	QSP 1 g/L (solution finale appliquée sur la plante)
25		

CULTURES	Nombre d'apports à différents stades de la campagne	Dose par apport
Vergers	3 - 6	8 L/ha
Cultures maraîchères	2 - 6	5 - 8 L/ha

SOLUTION N Fe Mn

Nitrate de manganèse	15 kg
Chlorure ferrique	25 kg
Eau	60 kg
5 Dérivés d'ulvanes	QSP 0,1 g/L (solution finale appliquée sur la plante)

CULTURES	Nombre de traitements	Dose par traitement
Vergers	4 – 6	3 – 6 L/ha
Cultures maraîchères	4 – 6	3 – 6 L/ha

SOLUTION N Mn Zn

10 Nitrate de Manganèse	31 kg
Nitrate de Zinc	22 kg
Eau	47 kg
Dérivés d'ulvanes	QSP 10 g/L (solution finale appliquée sur la plante)
15	

CULTURES	Nombre d'apports	Dose par apport
Maïs	1 - 2	4 – 8 L/ha
Lin	1 - 2	4 – 8 L/ha
Betterave	1 – 3	4 – 8 L/ha
Soja	1 – 2	4 – 8 L/ha
Pomme de terre	1 – 3	4 – 8 L/ha
Haricots pois	2 - 3	4 – 8 L/ha

SOLUTION NPK Oligoéléments

Urée	17 kg
Acide phosphorique	9 kg
20 Potasse	9 kg
Nitrate de Manganèse	0,7 kg
Nitrate de Zinc	0,3 kg
Nitrate de Cuivre	0,10 kg
Chlorure ferrique	0,20 kg
25 Acide borique	0,4 kg
Eau	63,3 kg
Dérivés d'ulvanes	QSP 1 g/L (solution finale appliquée sur la plante)

CULTURES	Nombre d'apports	Dose par apport
Cultures maraîchères	5 – 10	4 – 6 L/ha
Vergers	4 – 6	4 – 6 L/ha

SOLUTION BPK

Potasse	8 kg
Acide phosphorique	1 kg
5 Acide borique	1 kg
Eau	90 kg
Dérivés d'ulvanes	QSP 10 g/L (solution finale appliquée sur la plante)

10

CULTURES	Nombre d'apports	Dose par apport
Cultures maraîchères	2 – 4	3 – 5 L/ha
Cultures fruitières	3	5 L/ha

D - SOLUTIONS NUTRITIVES RACINAIRES (HYDROPONIE, GOUTTE A GOUTTE)

15

SOLUTION NPK Mg

Nitrate de potassium	50 g/L
Phosphate de potassium	27 g/L
Sulfate de magnésium	49 g/L
Dérivés d'ulvanes	200 g/L (ie. 1g/L de solution finale appliquée sur la plante)
20	

Dilution 1 L pour 200 L d'eau

25

SOLUTION N Ca Mg

Calcium nitrate	118 g/L
Chelate de fer	5 g/L
Dérivés d'ulvanes	100 g/L (ie. 0,5 g/L de solution finale appliquée sur la plante)
30	

Dilution 1 L pour 200 L d'eau

REVENDICATIONS

1. Utilisation des ulvanes, notamment extraits d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes, comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les ulvanes précités sont extraits d'algues choisies dans le groupe constitué des espèces suivantes : *Ulva armoricana*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva lactuca*, *Enteromorpha intestinalis* et *Enteromorpha compressa*, de préférence *Ulva armoricana*, *Enteromorpha intestinalis* et *Enteromorpha compressa*.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les extraits précités sont obtenus par un procédé comportant généralement les étapes suivantes : lavage, broyage, extraction (séparation solide-liquide) et éventuellement fractionnement et concentration.
4. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les oligosaccharides dérivés d'ulvanes précités sont obtenus par hydrolyse acide ou enzymatique.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la quantité efficace d'ulvanes ou d'oligo-saccharides dérivés d'ulvanes apportée aux plantes est de 0,1 g à 100 g par litre et préférentiellement de l'ordre de 1 g par litre pour les apports sous forme liquide, par voie foliaire, dans les solutions nutritives racinaires (hydroponie, goutte à goutte, ...) ou dans les solutions de traitement de semences ou post-récolte, ou bien encore de 10 à 1000 g par hectare et préférentiellement de l'ordre de 200 g par hectare pour les apports sous forme solide, par exemple, dans les produits pulvérulents ou granulés.
6. Procédé pour activer les réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques, caractérisé en ce qu'il comprend l'application aux dites plantes, d'une quantité efficace d'ulvanes, notamment extraits d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'application aux plantes est réalisée par voie foliaire ou par voie racinaire.

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la quantité efficace apportée aux plantes est de 0,1 g à 100 g par litre et préférentiellement de l'ordre 1 g par litre pour les apports sous forme liquide, par voie foliaire, dans les solutions nutritives racinaires
5 (hydroponie, goutte à goutte, ...) ou dans les solutions de traitement de semences ou post-récolte, ou bien encore de 10 à 1000 g par hectare et préférentiellement de l'ordre de 200 g par hectare pour les apports sous forme solide dans les produits pulvérulents ou granulés.

9. Produit phytosanitaire, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'au moins un ulvane, notamment extrait d'algues vertes du genre *Ulva* ou *Enteromorpha*, ou un oligosaccharide dérivé d'ulvane, éventuellement en association avec une ou plusieurs matières fertilisantes.
10

10. Produit phytosanitaire selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il se présente sous forme liquide ou sous forme de poudre ou de
15 granules et en ce qu'il contient une quantité d'ulvanes ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes permettant un apport aux plantes de 0,1 g à 100 g par litre et préférentiellement de l'ordre 1 g par litre pour les apports sous forme liquide, ou bien encore de 10 à 1000 g par hectare et préférentiellement de l'ordre de 200 g par hectare pour les apports sous
20 forme solide dans les produits pulvérulents ou granulés.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/000765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01N65/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FATIMA BI; SEEMA IQBAL: "Studies on aqueous extracts of three green algae as an elicitor of plant defence mechanism" PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY, vol. 31, no. 1, June 1999 (1999-06), pages 193-198, XP001204201 abstract page 194 page 196 - page 197; table 3	1-10
X	WO 91/07946 A (ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET A) 13 June 1991 (1991-06-13) examples 5,10	9,10
X	MACROMOLECULES, vol. 35, 2002, pages 6404-6411, XP002303820 abstract	9,10
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

26 August 2005

05/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina de Alba, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000765

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 262, 1994, pages 115-125, XP002303821 abstract page 116 - page 117 -----	9,10
A	WO 02/26037 A (LIENART YVETTE ; CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 4 April 2002 (2002-04-04) abstract page 8, line 25 - page 9, line 2 page 13, line 36 - page 14, line 3 page 15, line 11 - line 12 -----	1-10
A	WO 99/53761 A (LABOURDETTE GILBERT ; LATORSE MARIE PASCALE (FR); FRITIG BERNARD (FR);) 28 October 1999 (1999-10-28) page 2, line 6 - line 15 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/000765

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9107946	A 13-06-1991	FR 2655268 A1 AT 103171 T DE 69007626 D1 DE 69007626 T2 EP 0504236 A1 ES 2054485 T3 WO 9107946 A1 JP 5504583 T US 5508033 A			07-06-1991 15-04-1994 28-04-1994 25-08-1994 23-09-1992 01-08-1994 13-06-1991 15-07-1993 16-04-1996
WO 0226037	A 04-04-2002	FR 2814471 A1 AU 9200901 A CA 2424819 A1 EP 1359802 A2 WO 0226037 A2 JP 2004509906 T US 2004023924 A1			29-03-2002 08-04-2002 04-04-2002 12-11-2003 04-04-2002 02-04-2004 05-02-2004
WO 9953761	A 28-10-1999	FR 2777423 A1 AT 298508 T AU 3152699 A BR 9909722 A CA 2328300 A1 DE 69925994 D1 EP 1071332 A1 WO 9953761 A1 HR 20000693 A1 HU 0101671 A2 JP 2002511495 T US 6770303 B1 ZA 200006209 A			22-10-1999 15-07-2005 08-11-1999 26-12-2000 28-10-1999 04-08-2005 31-01-2001 28-10-1999 30-04-2001 28-09-2001 16-04-2002 03-08-2004 03-12-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000765

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A01N65/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FATIMA BI; SEEMA IQBAL: "Studies on aqueous extracts of three green algae as an elicitor of plant defence mechanism" PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY, vol. 31, no. 1, juin 1999 (1999-06), pages 193-198, XP001204201 abrégé page 194 page 196 - page 197; tableau 3 -----	1-10
X	WO 91/07946 A (ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET A) 13 juin 1991 (1991-06-13) exemples 5,10 -----	9, 10
X	MACROMOLECULES, vol. 35, 2002, pages 6404-6411, XP002303820 abrégé -----	9, 10
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgarion orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26 août 2005

05/09/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Molina de Alba, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000765

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 262, 1994, pages 115-125, XP002303821 abrégé page 116 - page 117 -----	9,10
A	WO 02/26037 A (LIENART YVETTE ; CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 4 avril 2002 (2002-04-04) abrégé page 8, ligne 25 - page 9, ligne 2 page 13, ligne 36 - page 14, ligne 3 page 15, ligne 11 - ligne 12 -----	1-10
A	WO 99/53761 A (LABOURDETTE GILBERT ; LATORSE MARIE PASCALE (FR); FRITIG BERNARD (FR);) 28 octobre 1999 (1999-10-28) page 2, ligne 6 - ligne 15 -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000765

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9107946	A 13-06-1991	FR 2655268 A1 AT 103171 T DE 69007626 D1 DE 69007626 T2 EP 0504236 A1 ES 2054485 T3 WO 9107946 A1 JP 5504583 T US 5508033 A	07-06-1991 15-04-1994 28-04-1994 25-08-1994 23-09-1992 01-08-1994 13-06-1991 15-07-1993 16-04-1996
WO 0226037	A 04-04-2002	FR 2814471 A1 AU 9200901 A CA 2424819 A1 EP 1359802 A2 WO 0226037 A2 JP 2004509906 T US 2004023924 A1	29-03-2002 08-04-2002 04-04-2002 12-11-2003 04-04-2002 02-04-2004 05-02-2004
WO 9953761	A 28-10-1999	FR 2777423 A1 AT 298508 T AU 3152699 A BR 9909722 A CA 2328300 A1 DE 69925994 D1 EP 1071332 A1 WO 9953761 A1 HR 20000693 A1 HU 0101671 A2 JP 2002511495 T US 6770303 B1 ZA 200006209 A	22-10-1999 15-07-2005 08-11-1999 26-12-2000 28-10-1999 04-08-2005 31-01-2001 28-10-1999 30-04-2001 28-09-2001 16-04-2002 03-08-2004 03-12-2001